



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE LA ENZIMA
CORISMATO MUTASA EN LA LEVADURA
Hansenula polymorpha.

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
p r e s e n t a :
MARIA TERESA ESPINOSA GARCÍA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Tesis 1977
M-135 1345

ECHA _____
ROC _____
S _____



QUÍMICA

JURADO ASIGNADO

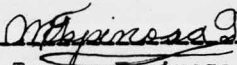
ORIGINALMENTE SE-
GUN EL TEMA.

PRESIDENTE: Profa. NATALIA SALCEDO O.
VOCAL: Prof. ALFREDO ECHEGARAY A.
SECRETARIO: Prof. SERGIO SANCHEZ E.
1er SUPLENTE: Profa BEATRIZ MEDINA .
2º SUPLENTE: Profa. RUTH ROMAN.

Sitio donde se desarrolló el tema:

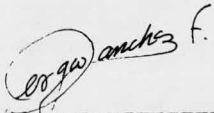
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA DEL INSTITUTO DE INVESTIGA+
CIONES BIOMEDICAS DE LA UNAM.

Nombre completo y firma del sustentante:



María Teresa Espinosa García.

Nombre completo y firma del asesor del tema:



Dr Sergio Sanchez Esquivel .

A MIS PADRES

CON CARÍÑO Y AGRADECIMIENTO POR LA
CONFIANZA QUE SIEMPRE HAN TENIDO
EN MI

A MIS HERMANOS

POR SER COMO SON

A MIS AMIGOS

TERE.

CON SINCERO AGRADECIMIENTO Y ESTIMACION
AL DR. SERGIO SANCHEZ ESQUIVEL POR SU
VALIOSA COOPERACION EN LA REALIZACION
DE ESTE TRABAJO.

INDICE.

INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	5
I Enzimas.	
II Mecanismos regulatorios.	
III Acido corísmico.	
IV Corismato mutasa.	
V Levaduras.	
MATERIAL Y METODOS.	26
I Microorganismos usados.	
II Medios de cultivo.	
III Obtención del ácido corísmico.	
IV Determinación de la actividad enzimática.	
RESULTADOS	37
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFIA	50.

CAPITULO I

I N T R O D U C C I O N .

Los principales objetivos del grupo de investigación dentro del cual se realizó esta tesis son:

La producción de proteína microbiana, así como la obtención del aminoácido esencial L-triptofano a partir de la levadura Hansenula polymorpha. Este microorganismo presenta la ventaja de utilizar fuentes de carbono no convencionales como son el metanol, etanol, además de las ya usuales como glucosa, sacarosa, maltosa, melaza, etc.

El por qué del interés de producir L-triptofano radica en varias razones:

- a) El triptofano es uno de los ocho aminoácidos esenciales para el hombre.
- b) Su proceso de síntesis química es ineficiente ya que se obtiene una mezcla racémica de los isómeros L y D, de los cuales sólo el primero puede ser utilizado por el organismo, en cambio, cuando se produce biológicamente se obtiene únicamente el isómero L.
- c) En México la dieta más común es a base de maíz y de frijol, alimentos que son pobres en proteína y ricos en carbohidratos. Esta proteína es deficiente en L-triptofano y L-lisina en el caso del maíz y en L-metionina, L-lisina y L-triptofano en el caso del frijol. (28)

En la Universidad de Purdue se logró obtener una mutante del maíz (opaco-2) la cual produce una mayor concentración de L-lisina, no así de L-triptofano.

La baja proporción de estos aminoácidos en estos alimentos no cubre las necesidades nutricionales del orga-

nismo humano, por lo que se considera que un posible mecanismo para hacer estos alimentos más completos sería enriquecer la dieta del Mexicano con L-triptofano.

Una forma de producir L-triptofano es por fermentación es decir, obteniendo cepas que lo hiperproduzcan. Lo anterior se puede lograr buscando cepas insensibles a la regulación - por los metabolitos que intervienen en la biosíntesis de este aminoácido. Esta des-regulación se produce cuando se emplean análogos de L-triptofano en el medio de cultivo que inhiban el crecimiento de Hansenula, tales como 6fluoro triptofano, 7 aza triptofano, 7metil triptofano, 5 metil triptofano; estos análogos pueden evitar el crecimiento del microorganismo al actuar sobre las enzimas reguladoras de la biosíntesis de triptofano, o sea, hay una competencia entre el análogo y el aminoácido natural por el sitio activo de estas enzimas, impidiendo así que se concluya la síntesis del producto requerido y como consecuencia el microorganismo no pueda crecer . (7)

Esta condición permitiría aislar positivamente mutantes capaces de crecer aún en presencia del análogo. La nueva propiedad adquirida podría deberse a una insensibilidad de - sus enzimas reguladoras a la retroinhibición por el producto de la vía y de esta forma , la célula sintetizará una mayor concentración del aminoácido deseado. (M. E. Flores y S. Sánchez artículo en preparación.)

Otra manera de aumentar la producción de L-triptofano es buscando mutantes que requieran L-fenilalanina y L-tirosina para crecer y por ello sean incapaces de hacerlo en un medio mínimo (formado de una fuente de carbono , glucosa una fuente de nitrógeno y sales minerales). Es decir, se pretende obtener cepas con un bloqueo total o parcial en la co-

rismato mutasa, primera enzima en la biosíntesis de L-fenilalanina y L-tirosina, que actúa sobre el ácido corísmico, el cual a su vez también es precursor de L-triptofano, a través de la enzima antranilato sintetasa. Como resultado de este evento mutacional, el ácido corísmico podrá ser utilizado únicamente por la enzima antranilato sintetasa para la biosíntesis de L-triptofano.

También se puede hacer una combinación de los dos métodos anteriores, es decir, crear una mutante que requiera para crecer L-tirosina y L-fenilalanina por tener afectada sus corismato mutasa y que además sus enzimas sean insensibles a la regulación por triptofano; de esta forma habrá una hiperproducción del aminoácido.

Recientemente fueron aisladas en este laboratorio mutantes con requerimiento parcial para L-fenilalanina y L-tirosina a partir de la cepa silvestre, sin embargo este hecho no garantiza que su enzima corismato mutasa se encuentre afectada, aún cuando produjo casi dos veces más L-triptofano que la cepa original.

Desafortunadamente los estudios nutricionales para localizar los bloqueos se ven limitados debido a que el ácido corísmico, sustrato de la enzima, y el ácido prefénico, producto de la actividad de la enzima corismato mutasa no pueden ser transportados al interior de la célula. Una alternativa más específica para ello es usando métodos bioquímicos, lo que equivale a buscar y medir la actividad de la enzima antes mencionada in vitro, comparativamente con la cepa original.

Dado que la enzima corismato mutasa no ha sido objeto de estudios anteriores en la levadura Hansenula polymorpha, se pretende en este trabajo buscar las condicio

nes para extraerla y determinar su actividad, lo que permitirá conocer sus características cinéticas y regulatorias, y así eventualmente obtener más información para el diseño de nuevos esquemas de mutación sobre bases más racionales, con el fin de hiperproducir el aminoácido deseado.

CAPITULO II

OBJETIVO.- Determinar las condiciones adecuadas para medir la actividad in vitro de la enzima corismato mutasa en la levadura Hansenula polymorpha, así como estudiar sus características cinéticas y regulatorias. Finalmente determinar la actividad de esta enzima en una mutante con requerimientos parciales para L-fenilalanina y L-tirosina que es capaz de producir mayor concentración de L-triptofano que la cepa silvestre.

GENERALIDADES .

I ENZIMAS.- Las enzimas son proteínas con actividad catalítica, que pueden ser clasificadas de acuerdo al tipo de reacción en que intervienen en los siguientes grupos:

- Grupo 1.- Oxido-reductasas. Catalizan las reacciones de oxidación y reducción.
- Grupo 2.- Transferasas. Intervienen en la transferencia de grupos funcionales.
- Grupo 3.- Hidrolasas. En reacciones de hidrólisis.
- Grupo 4.- Liasas. Adición a los dobles enlaces.
- Grupo 5.- Isomerasas. Reacciones de isomerización.
- Grupo 6.- Ligasas. Formación de enlaces con ruptura de ATP

Algunas enzimas son proteínas simples y otras son proteínas conjugadas por tener grupos prostéticos, coenzimas o ambos. Las coenzimas actúan como grupos transportadores de electrones o de grupos funcionales específicos.

Las reacciones enzimáticas están a las leyes termo

dinámicas por lo que siguen el mismo comportamiento que una reacción química. En base a su cinética pueden ser de orden cero, primero, segundo y en raras ocasiones de tercer orden.

Las reacciones de orden cero son aquellas en las que la velocidad de reacción depende de la concentración del catalizador y no del número de reaccionantes .

Las reacciones de segundo orden son en las que su velocidad de reacción es proporcional al producto de la concentración de dos reaccionantes.

Reacciones de tercer orden son en las que su velocidad de reacción es proporcional al producto de la concentración de tres términos diferentes.

Además de seguir la cinética de las reacciones químicas las enzimas se ven afectadas por fenómenos de saturación por el sustrato.

El efecto de saturación condujo a M. Michaelis y a L. M. Menten a formular una teoría general de la acción de las enzimas y de su cinética, de la que se derivó la siguiente ecuación:

v = velocidad de reacción.

V_{max} = velocidad máxima.

K_m = constante de Michaelis-Menten.

$[S]$ = concentración del sustrato.

$$v = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

Esta ecuación define las relaciones cuantitativas entre la velocidad de reacción y la concentración del sustrato, si se conoce $V_{máx}$ o K_m .

K_m es igual a aquella concentración de sustrato - que corresponde a al mitad de la velocidad máxima; puede - variar con la estructura del sustrato, con el pH y con la temperatura.

Las enzimas como cualquier otro tipo de catalizador son susceptibles a inhibición, mecanismo que representa una forma de control en las reacciones celulares pudiendo ser de varios tipos.

INHIBICION COMPETITIVA.- Un inhibidor competitivo es una sustancia que se combina con la enzima libre de tal forma que impide su unión con el sustrato. El inhibidor puede - ser un análogo no metabolizable, un derivado del sustrato verdadero o un producto de la reacción. Los modelos de - inhibición competitiva más frecuentes son :

- a.- Competencia del sustrato y del inhibidor por el mismo sitio en la enzima. Fig 1
- b.- Que los sitios del inhibidor y del sustrato sean independientes, pero que el inhibidor al entrar forme un impedimento estérico a la entrada del sustrato. Fig 2
- c.- Que el inhibidor y el sustrato compartan un sitio común en la enzima. Fig 3
- d.- Que los sitios de unión del inhibidor y del sustrato sean distintos pero se sobrepongan. Fig 4
- e.- Que la unión del inhibidor y del sustrato a la enzima sea en sitios distintos, pero al entrar alguno de los dos se producen cambios conformacionales en el sitio que está aún vacío. Fig 5



Fig. 1

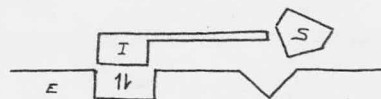


Fig. 2

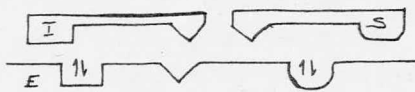


Fig. 3

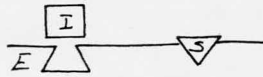
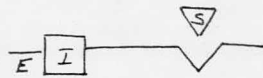
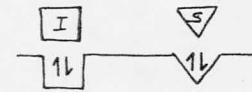


Fig. 5

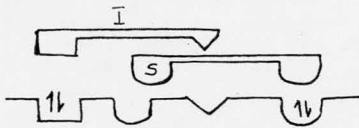
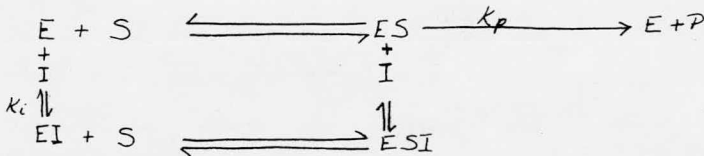
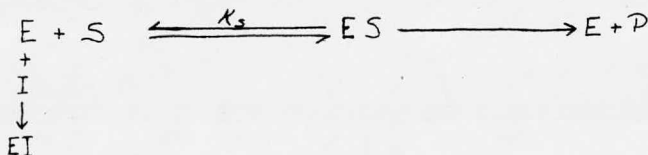


Fig. 4

INHIBICION NO COMPETITIVA.- El inhibidor no tiene efectos sobre el sitio de unión del sustrato con la enzima libre, la unión puede ser Sustrato-Inhibidor, esta unión será al azar y reversible en diferentes sitios, también la unión puede ser entre Inhibidor-Enzima y entre Enzima-Sustrato, el resultado de la unión es Enzima-Sustrato-Inhibidor, - complejo catalíticamente inactivo. El esquema de reacción es:



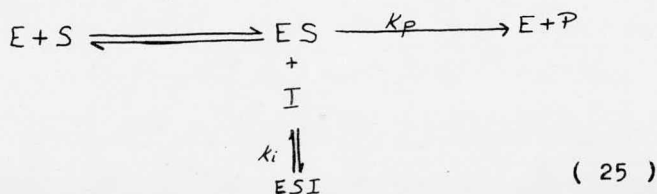
INHIBICION IRREVERSIBLE.- Una sustancia que se combina irreversiblemente con una enzima puede asemejarse a un inhibidor no competitivo, porque V_{max} decrece pero K_m permanece igual. Las reacciones son:



Un inhibidor irreversible puede distinguirse de un inhibidor clásico no competitivo por la gráfica de V_{max} contra la cantidad total de enzima adicionada a la mezcla de reacción en presencia del inhibidor.

INHIBICION INCOMPETITIVA.- Un inhibidor incompetitivo es un compuesto que se une reversiblemente a un complejo Enzima-Sustrato produciendo otro complejo Enzima-Sustrato-Inhibidor inactivo. El inhibidor no se une a la enzima libre.

La inhibición es descrita con el siguiente equilibrio:



II MECANISMOS REGULATORIOS.- En general todos los caminos - para la biosíntesis de los aminoácidos en las distintas especies de bacterias, hongos y plantas superiores son similares, presentando diferencias únicamente en los mecanismos regulatorios a los que están sujetas sus enzimas.

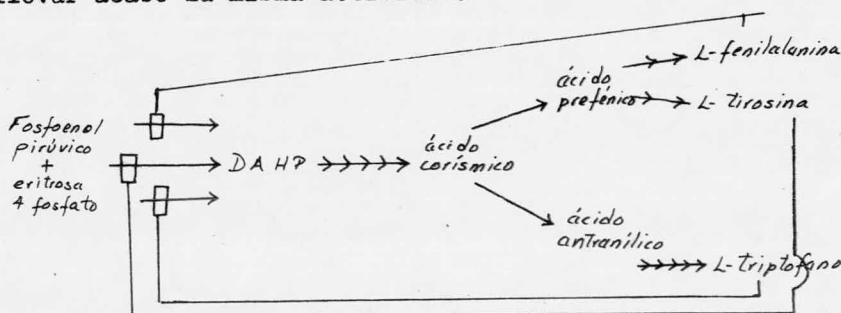
Varios tipos de mecanismos regulatorios son los que se pueden encontrar; dichos controles tienen su blanco de acción a nivel de DNA, como son la retro-represión y la inducción o bien a nivel enzimático como ocurre en la retro-inhibición y la activación.

A nivel de DNA la retro-represión sucede cuando se impide la síntesis de la enzima porque sus genes reguladores - inhiben la transcripción del gene estructural específico, - que es el portador del mensaje que codifica la secuencia de aminoácidos de la enzima (7).

La inducción ocurre cuando un metabolito es capaz de estimular la formación de una enzima determinada, ya sea por la liberación de la represión como en el caso del control negativo (7) o bien por la formación de un inductor activo como se realiza en el control positivo (7) .

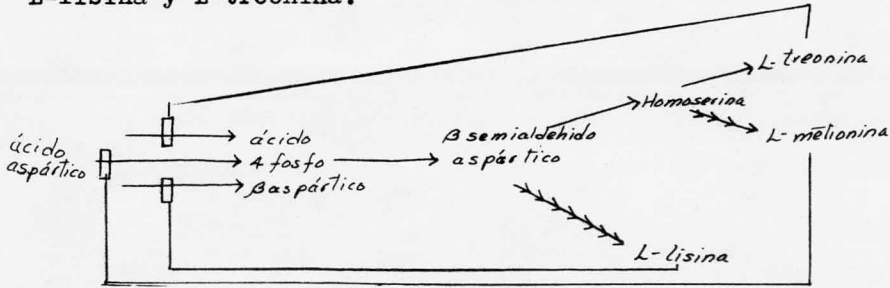
La retroinhibición puede ser en varias formas:

1.- Por Isoenzimas. En este caso una misma función o actividad puede ser realizada por más de una enzima. Este mecanismo ocurre fundamentalmente en vías biosintéticas ramificadas, es decir, aquellas que dan origen a varios productos finales. Un ejemplo típico es la primera enzima de la vía biosintética de los aminoácidos aromáticos, representada por las tres formas de DAHP sintetasa (7 fosfo D-arabino heptulosonato sintetasa) en E. coli (22) cada una de estas tres formas es inhibida específicamente por L-triptofano, L-tirosina, o L-fenilalanina productos finales de la vía; a pesar de llevar acabo la misma actividad.

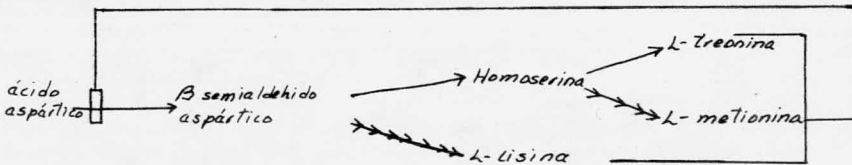


Otro ejemplo se presenta en la biosíntesis de los aminoácidos de la familia del ácido aspártico en E. coli (22); en este caso existen tres aspartato cinasas, capaces de catalizar la primera reacción de esta vía para formar ácido 4 fosfo β aspártico a partir de -

ácido aspártico, dichas enzimas también son reguladas por los productos finales de la vía ramificada, L-metionina, L-lisina y L-treonina.

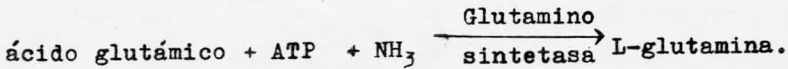


2.- Inhibición concertada o multivalente. Es cuando se necesita que estén presentes dos o más productos metabólicos para que haya inhibición de la actividad enzimática. Un ejemplo es en Bacillus polymixa (18) también en la biosíntesis de los aminoácidos de la familia del ácido aspártico, en este caso existe sólo una aspartato cinasa que es inhibida únicamente cuando están presentes L-treonina y L-lisina, no así cuando sólo está uno de los dos aminoácidos.



3.- Inhibición acumulativa. Ocurre cuando varios inhibidores están simultáneamente presentes en concentraciones saturadas y actúan sobre la misma enzima. Aquí la inhibición de la actividad será la suma de las inhibiciones de cada uno de los metabolitos independientemente. Este mecanismo fue descrito por Waulfalk y Stadman para el control de la glutamino sintetasa; inicialmente para E. coli (22) y después extendida para eucariotes y otros procariontes.

La glutamino sintetasa es inhibida por L-triptofano, carbamilo fosfato, monofosfato de adenosina (AMP), L-glicina, L-histidina, glucosamina 6 fosfato y trifosfato de citidina (CTP). Es importante mencionar que la biosíntesis de estos metabolitos depende directa o indirectamente de la concentración de L-glutamina en la célula. La glutamina se forma a partir de ácido glutámico mediante la siguiente reacción:



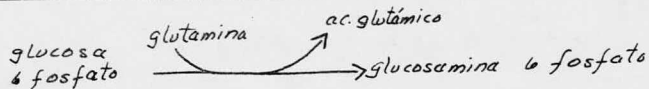
en general la glutamina actúa como fuente donadora de grupos amino según se puede apreciar en la siguiente tabla:

BIOSINTESIS DE:	REACCIONES EN LASQUE INTERVIENE LA L-GLUTAMINA.
TRIPTOFANO	
HISTIDINA	
CARBAMIL FOSFATO	$2 \text{ATP} + \text{glutamina} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{carbamil fosfato} + 2 \text{ADP} + \text{Pi} + \text{ac. glutámico}$
CTP	

BIOSINTESIS
DE:

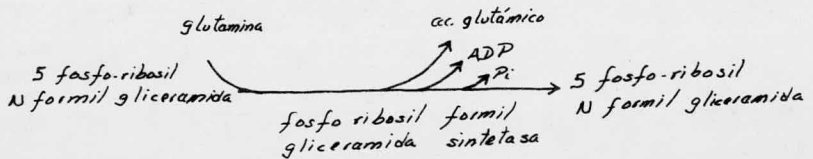
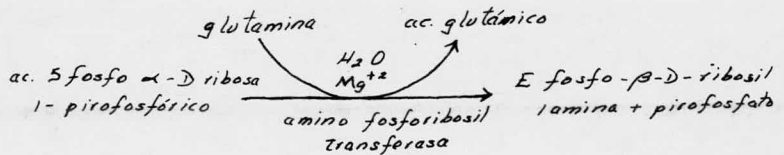
REACCIONES EN LAS QUE INTERVIENE LA
L- GLUTAMINA.

GLUCOSA AMINO
6 FOSFATO



En la biosíntesis de AMP, la glutamina interviene como donadora del grupo amino en las siguientes reacciones:

AMP



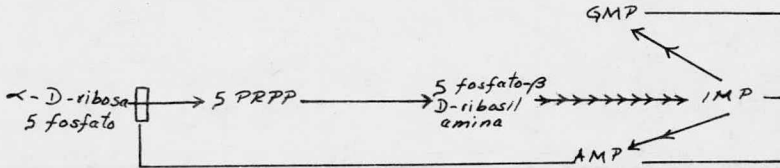
Con cuatro reacciones posteriores a esta última se forma el ácido inosínico (IMP) precursor del AMP.

L-glicina y L-alanina son también capaces de inhibir a la glutamino sintetasa aunque en estos casos la glutamina no interviene en su síntesis.

4.- Inhibición cooperativa. Este mecanismo se presenta cuando hay más de un metabolito capaz de inhibir la actividad enzimática. Sin embargo, cuando están presentes todos estos compuestos, el porcentaje de inhibición es mayor que la suma de las inhibiciones individuales.

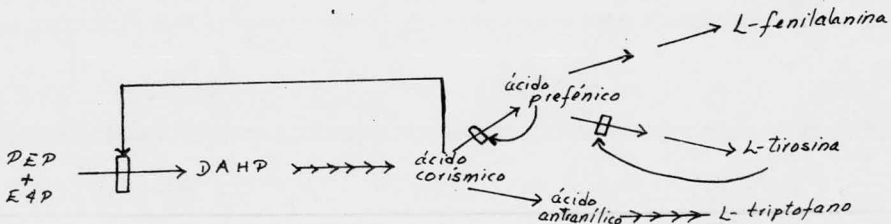
Este tipo de inhibición fue descrita por Caskey et al. (22) en la biosíntesis de purinas en el tejido animal; la segunda reacción de esta síntesis es catalizada por la

glutaminofosfo-ribosilpirofosfato amino transferasa, que es inhibida por monofosfato de guanosina (GMP), IMP y monofosfato de adenosina (AMP). Cuando todas están presentes la inhibición es mayor que la suma de cada una de sus inhibiciones.

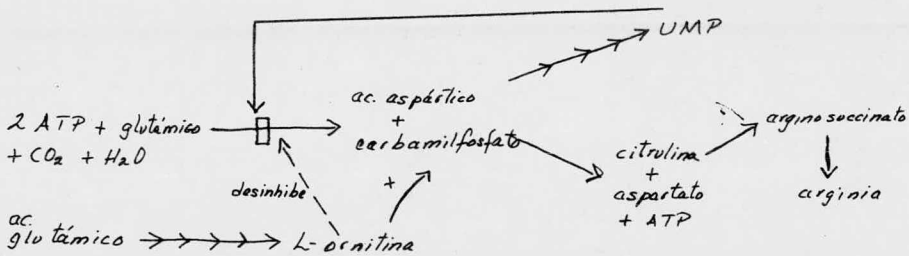


5.- Inhibición secuencial. Consiste esencialmente en la inhibición de un paso enzimático intermedio, por el producto final de una vía, lo que produce la acumulación de un metabolito intermedio. Al acumularse dicho metabolito se ocasiona la inhibición de un paso enzimático anterior y así sucesivamente se van inhibiendo las enzimas por sus productos hasta llegar a la primera reacción de la síntesis.

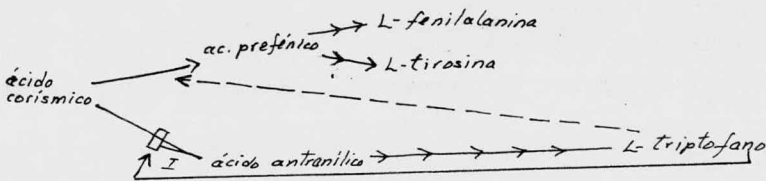
Este tipo de inhibición fue descrita por Nester y Jensen en la vía de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos en Bacillus subtilis (20) en donde L-tirosina inhibe a la pterinato deshidrogenasa, una enzima de la vía, lo cual ocasiona la acumulación del ácido pterínico, éste a su vez inhibe a la corismato mutasa y se acumula el ácido corísmico, lo que provoca la inhibición de la DAHP sintetasa primera enzima de la biosíntesis.



6.- Inhibición compensatoria. Este mecanismo se presenta cuando un mismo metabolito es producido en diferentes vías en una de las cuales actúa como inhibidor y en la otra como activador. Por ejemplo, en la biosíntesis de uridina y de arginina en E. coli, el monofosfato de uridina (UMP) retro-inhibe a la carbamilsulfato sintetasa excepto en presencia de L-ornitina, metabolito intermediario en la biosíntesis de L-arginina. La ornitina revierte la inhibición por UMP en un 40%.



Activación. El mecanismo contrario a la inhibición es la activación. Esta consiste en la estimulación de una enzima para que utilice preferentemente un sustrato hacia la formación de un producto determinado. Por ejemplo en la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos en S. cerevisiae donde el L-triptofano inhibe a la antranilato sintetasa (I) y activa a la corismato mutasa (II) para que el ácido corísmico se canalice hacia la síntesis de L-tirosina y L-fenilalanina, una vez que el triptofano ha empezado a acumularse.

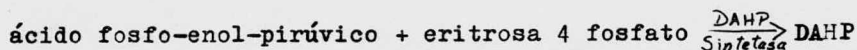


Tanto la represión e inducción como la inhibición y activación pueden ocurrir en una misma vía biosintética para llevar a cabo su regulación.

En el caso de los aminoácidos aromáticos su biosíntesis presenta una línea común que principia con el ácido fosfo enol-pirúvico mas eritrosa 4 fosfato, ambos compuestos proceden del metabolismo de los carbohidratos, y a través de la enzima DAHP sintetasa forman el ácido 3-desoxi, D-arabino heptulosónico 7 fosfato (DAHP), después por cinco reacciones enzimáticas se obtiene el ácido corísmico, en donde hay una ramificación hacia L-triptofano por un lado y hacia L-tirosina y L-fenilalanina por el otro. fig 6

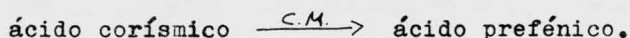
Las enzimas que participan en esta vía son las siguientes:

a) DAHP sintetasa .- Cataliza la primera reacción de la síntesis.



b) Las enzimas que catalizan los cinco pasos que se suceden entre DAHP y ácido corísmico son :
deshidroquinato sintetasa, 5 deshidroquinato deshidratase, shikimato deshidrogenasa, shikimato cinasa, fosfopiruvil shikimato sintetasa y corismato sintetasa. Parece ser que estas enzimas no están involucradas en la regulación por productos finales.

c) Corismato mutasa.- Esta enzima es importante en la regulación, por ser la primera en la ramificación para la síntesis tanto de L-fenilalanina como de L-tirosina. Cataliza la reacción:



ABREVIATURAS DE LA FIGURA 6

PEP = Acido fosfo enol pirúvico

EP = eritrosa 4 fosfato.

DAHP= Acido 7 fosfo D-arabino heptulosónico.

DHQ = Acido 5 deshidroquímico.

DHS = Acido 5 deshidroshikímico.

SA = Acido shikímico.

SAP = Acido 5 fosfo shikímico.

MS5P= Acido 5 enol pirúvil shikímico .

CA = Acido corísmico.

AA = Acido antránílico.

PRA = Acido N-(5- fosforibosil) - antránílico.

CDRP = 1-(o-carboxifenilalanina -l- deoxirribulosa-5-
fosfato.

IGP = indol glicerol fosfato.

PA = Acido prefénico.

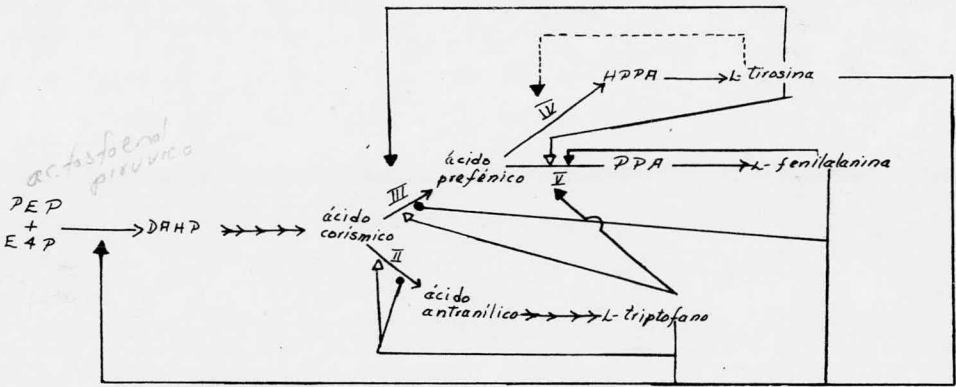
PPA = Acido fenil pirúvico.

HPPA = Acido p-hidroxi fenil pirúvico.

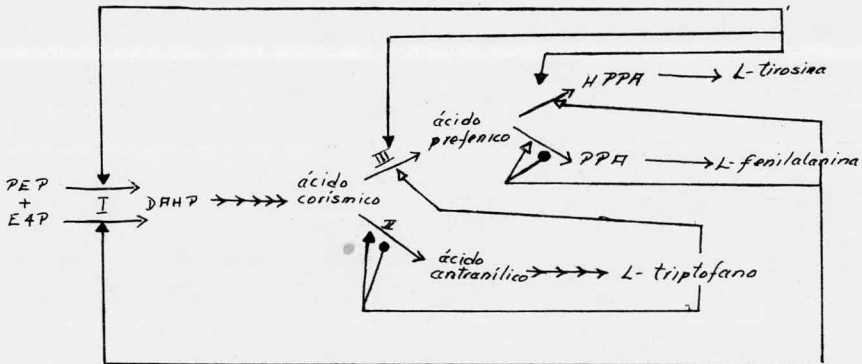
Phen = Fenilalanina.

Tir = tirosina.

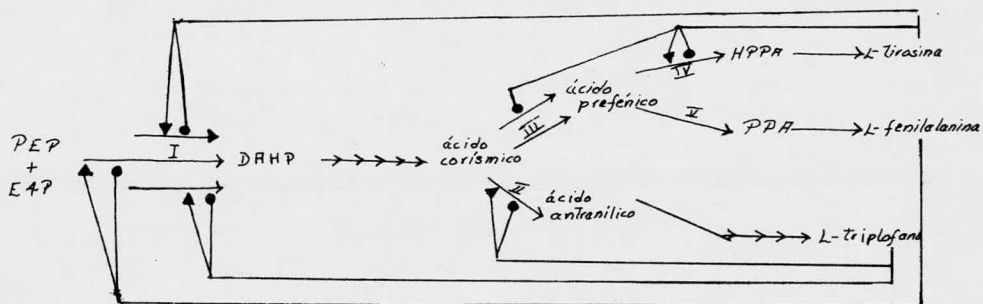
Trip = triptofano.



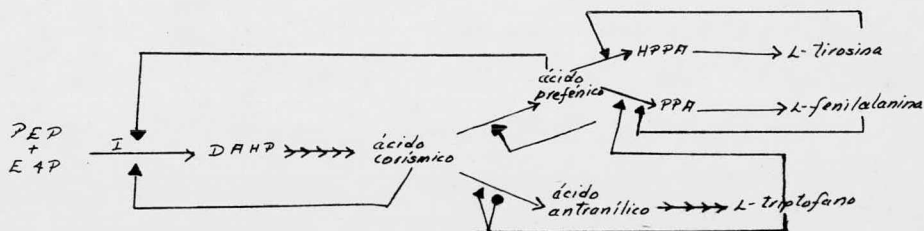
Regulación de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos en Corynebacterium glutamicum (14) fig. 7



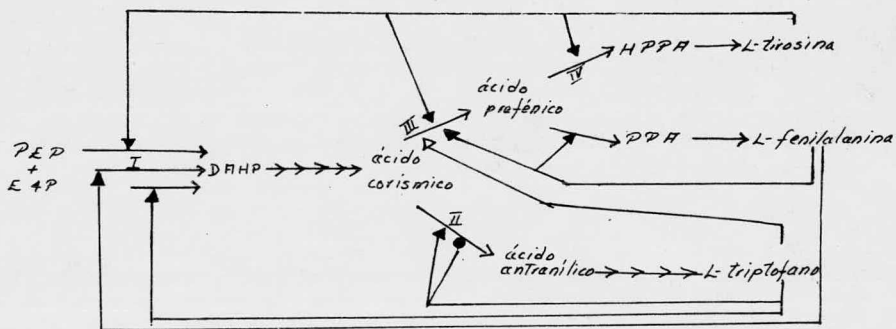
Regulación de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos en Saccharomyces cerevisiae (14) fig. 8



Regulación de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos en Escherichia coli (14) fig 9



Regulación de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos en Bacillus subtilis (14) fig 10



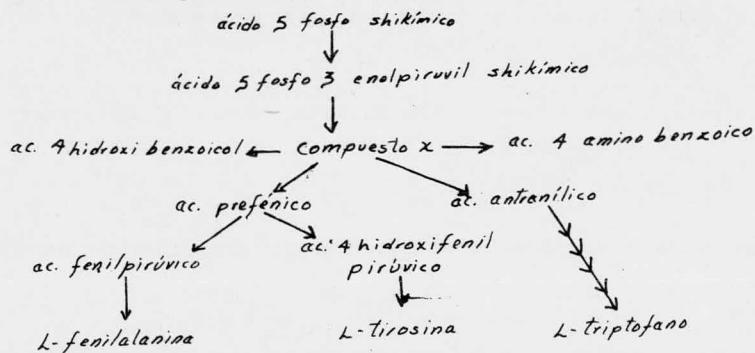
Regulación de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos en Neurospora crassa (14) fig. 11

III ACIDO CORISMICO.- El último metabolito del segmento lineal en la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos es el ácido corísmico.

Este ácido fue identificado por primera vez por Gibson y Gibson en 1964 (11) quienes además sugirieron un esquema para la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos (12); basándose en las observaciones de Levin y Sprinson - en 1960 de que el ácido 5 fosfo 3 enolpiruvil shikímico era un precursor común a los tres aminoácidos y en el comportamiento de unas mutantes descritas por Davis y Mingioli en 1953, las cuales acumulaban ácido 5 fosfo 3 enolpirúvil - shikímico y requerían para crecer L-fenilalanina, L-tirosina, L-triptofano, ácido 4amino benzoico y ácido 4 hidroxi benzoico .

De acuerdo con esto Gibson y Gibson dedujeron que existía un compuesto X adelante del ácido 5fosfato 3 enol piruvil shikímico, de tal modo que si se ocasionaba una mutación que impidiera la formación del compuesto X se obtendría un triple auxótrofo. Esta mutante llenaría las características de la mutante descrita por Davis y Mingioli respecto a sus requerimientos.

El esquema sugerido fue:



Gibson y Gibson se dedicaron a seleccionar mutantes de Aerobacter aerogenes que fueran capaces de acumular el compuesto X, hasta que obtuvieron la cepa 62-1 que requiere para crecer L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptofano; para los dos primeros aminoácidos se pensó que tenía un bloqueo en la enzima que transformaba el compuesto X en ácido prefénico. Para el triptofano el bloqueo se localizaría en la enzima que transformaba el ácido antranílico en indolglicerol fosfato.

Una vez aislado el compuesto que acumulaba esta mutante se iniciaron los estudios para deducir su estructura y conocer sus características químicas.

Se le dió el nombre de ácido corísmico (del griego Choris que significa bifurcación.)

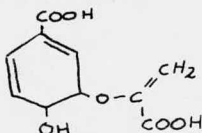
El ácido corísmico es un compuesto lábil que se convierte química y enzimáticamente en varios intermedios de la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos como: ácido antranílico, ácido prefénico, ácido fenilpirúvico, ácido 4-hidroxifenilpirúvico, ácido 4-hidroxi benzoico. - Estudios posteriores mostraron que también es precursor de algunas vitaminas como: ácido p-amino benzoico, ácido fólico y de la vitamina K (9, 10).

Su espectro en ultra violeta tiene un máximo de absorción a 274 nm cuando está en medio alcalino y a 282 nm cuando está en éter. (9)

Los cristales del ácido corísmico son bien definidos pero muestran una marcada tendencia a retener a las moléculas de solvente (11, 12), es soluble en éter, agua e insoluble en éter de petróleo.

La fórmula molecular del ácido fue establecida como $C_{10}H_{10}O_6$ por espectroscopía de masas. Su peso molecular es de 226.2 con punto de fusión de 148-149° C (se descompone al calentarlo)

Su fórmula estructural es :



ácido [-(5-carboxi-1,2-dihidro-2-hidroxi fenoxi)]acrílico.

IV ENZIMA CORISMATO MUTASA.- La enzima corismato mutasa cataliza la conversión del ácido corísmico en ácido prefénico, precursor común de los aminoácidos L-tirosina y L-fenilalanina.

Algunos reportes han mostrado que la enzima corismato mutasa en microorganismos como E. coli (5) - A. aerogenes (5) S. typhimurium (23) y Pseudomonas aeruginosa (3) presentan dos formas moleculares distintas, una formando un complejo con la prefenato deshidratasa regulada por fenilalanina y la otra formando un complejo con la prefenato deshidrogenasa, controlada por la tirosina.

En Bacillus subtilis (20) se aislaron dos tipos diferentes de cepas, en relación a la corismato mutasa, una con tres isoenzimas, que no son inhibidas por ninguna de los aminoácidos aromáticos y otra con una corismato mutasa la cual correspondió a una de las enzimas encontradas en la cepa anterior (en base a su peso molecular). Esta enzima tampoco fue regulada por los productos finales pero sí por el ácido prefénico.

En Claviceps paspali (22) fue reportado que dos cepas la Pb 156 y la SD 5S, muestran diferencias en su corismato mutasa cuando se hacen crecer bajo idénticas condiciones. La cepa Pb 156 posee dos isoenzimas, una de ellas se encuentra en mayor concentración que la otra, esta isoenzima es inhibida por el triptofano. La cepa SD 5S tiene sólo una corismato mutasa, regulada de la misma manera que la isoenzima que se encuentra en mayor concentración de la cepa antes mencionada.

Para Neurospora crassa (2) se ha descrito sólo una corismato mutasa, la cual es inhibida alostéricamente por triptofano, pero no afecta las funciones de la pefenato deshidrogenasa ni de la pefenato deshidratasa; indicando que estas enzimas no están estructuralmente asociadas.

Algunas algas como Euglena, Chlamidomonas, Zygnema y Ankistodesma tienen el mismo patrón regulatorio que el hongo antes mencionado (22).

En plantas superiores son pocos los reportes sobre esta enzima. En el chícharo Pisum sativum se ha demostrado su presencia, siendo su regulación igual que en Neurospora (6).

La corismato mutasa de Corynebacterium glutamicum (13), es inhibida fuertemente por L-fenilalanina y aún más por la combinación de tirosina y fenilalanina juntas. El triptofano estimula la actividad de esta enzima revirtiendo la inhibición producida por los aminoácidos anteriores.

En Saccharomyces cerevisiae (17) se ha reportado que la actividad de esta enzima se inhibe por tirosina pero no por fenilalanina y que la inhibición de la actividad enzimática se revierte por triptofano.

V LEVADURAS.- Las levaduras son hongos unicelulares que no forman un micelio verdadero. Taxonómicamente pueden localizarse dentro de la división Tallophyta, subdivisión Sumycetes, y clase Ascomycetes, Basidiomycetes o Deuteromycetes (21).

Pueden presentar reproducción asexual por división celular; algunas levaduras se dividen en dos células iguales, pero muchas de ellas se dividen en dos células inicialmente desiguales por un proceso conocido como gemación.

El sexual típico en las levaduras implica la fusión de dos células uninucleadas desiguales iguales - seguidas casi inmediatamente por fusión nuclear. La célula resultante se agranda y se transforma en un asca, el núcleo diploide sufre meiosis después de lo cual los cuatro núcleos haploides resultantes pueden madurar directamente en ascosporas o se pueden dividir de tal forma que se producen ocho ascosporas en cada asca.

Las levaduras poseen una pared celular definida - que contiene mananos (polímeros del azúcar manosa) y levanas (polímeros del azúcar fructosa). Poseen gran variedad de formas, algunas veces se adhieren en cadenas dando apariencia de pseudomicelio. Son células incoloras, que generalmente forman colonias blancas, cremosas, en algunas ocasiones de color café, sus ascosporas son normalmente ovoides y su número de cuatro a ocho aunque pueden encontrarse en otro número. (8)

Se les puede hallar abundantemente en sustratos que contienen azúcar (néctar de flores y en la superficie de algunos frutos) también se encuentran en el suelo, en la leche, en hojas y tallos de los vegetales. (1)

La levadura utilizada en la realización de este trabajo pertenece al género Handenula. Esta levadura fue des-

crita por Wickeham en 1951 (27) quien además hizo un estudio extensivo de este género, incluyendo varias especies nuevas, las cuales tenían la capacidad de asimilar los nitratos, aunque su capacidad para formar pseudomicelio estaba poco desarrollada o ausente.

Wickerham dió una nueva definición del género: Levaduras que se reproducen asexualmente por gemación o - por gemación acompañada de pseudomicelio, hifas verdaderas de una a cuatro ascosporas por asca y asimilan nitratos.

Las esporas del género Handenula pueden presentar forma de sombrero o de saturno.

La primera especie descrita fue H. anomala que es el prototipo del género, presenta pseudomicelio y posee capacidad para asimilar los nitratos. La especie es muy común y puede aislarse de varias fuentes.

Otra especie es H. wingei la cual no tiene capacidad para simular los nitratos, es heterotática (una levadura heterotática es aquella que su conjugación se realiza con esporas en diferentes talos). Con esporas en forma de saturno.

La especie que es de nuestro interés es H. polymorpha (De Morais et Maia) sinónimos H. augusta (Teunessan, Hallet Wickerham 1960) . (27)

Esta especie fue primero descrita por Wickerham quien se refiere a ella como : Cepas haploides y diploides, claramente elipsoidales o cilíndricas. Las células haploides son en pares o se encuentran solas. Las células diploides son esféricas o esferoidales y pueden aglutinarse en grandes acúmulos. Las colonias de ambos ploidios son suaves, brillantes, mantequillosas, enteras y carecen de hifas. Las

colonias que esporulan suficientemente llegan a ser rosas o rojas. Esta especie existe en la naturaleza predominantemente o quizá exclusivamente como células haploides, pero durante su aislamiento produce numerosas células diploides. Las ascosporas son pequeñas hemiesferoidales, con bordes estrechos, se encuentran de una a cuatro por asca, son más resistentes al calor que las esporas de otras especies.

Fermenta la glucosa pero no la galactosa; pueden utilizar como fuente de carbono sacarosa, maltosa, celobiosa, melaza, etanol, metanol, etc. Crecen bien a 37° C pero pueden hacerlo a temperaturas mayores.

CAPITULO III

M A T E R I A L Y M E T O D O S .

I MICROORGANISMOS USADOS.

a) Cepa silvestre de la levadura H. polymorpha.

Aislada por Levine y Cooney en 1972 a partir del suelo por su capacidad para utilizar metanol como fuente de carbono para crecer (15).

b) Cepa $L_{\frac{1}{2}}$ mutante de H. polymorpha, aislada en este laboratorio a partir de la cepa silvestre, por su característica de ser auxótrofa a los aminoácidos L-fenilalanina y a L-tirosina.

c) Cepa 62-1 de Aerobacter aerogenes; donada por el Dr F. Gibson del departamento de Bioquímica de la Universidad de Nacional de Australia; Camberra, Australia A. C. T. Esta cepa es un triple auxótrofo para los aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptofano.

II MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE PRESERVACION DE LOS MICROORGANISMOS EMPLEADOS.

a) La cepa silvestre H. polymorpha fue mantenida en medio mínimo sólido, compuesto de sales minerales, glucosa como fuente de carbono y NH_4NO_3 como fuente de nitrógeno, este medio básico fue reportado por Fink en 1972 (10), consta de tres soluciones que contienen lo siguiente:

Solución 1

Vitaminas y elementos huella.

Mg $SO_4 \cdot 7 H_2O$	50 g
Na Cl	10 g

Triamina	40 mg
Biotina	0.2 mg
Fe Cl ₃ . 6H ₂ O	5 mg
Zn SO ₄ . H ₂ O	7 mg
H ₃ BO ₃	1 mg
Cu SO ₄ . H ₂ O	1 mg
KI	1 mg
H ₂ O	c. b.p. 1000 ml

Solución 2

Solución amortiguadora de fosfatos.

K H ₂ PO ₄	87.5 g
K ₂ HPO ₄	12.5 g
H ₂ O . bidestilada	c. b. p. 1000 ml

Solución 3

Ca Cl ₂ . 2H ₂ O	10 g
H ₂ O bidestilada	c.b.p. 1000 ml

Las soluciones se emplean al 1% .

El medio se preparó con la siguiente secuencia:

- 10 ml de la solución 1
- 200 ml de agua bidestilada
- 10 ml de solución 2
- 10 ml de solución 3
- glucosa al 2%
- NH₄NO₃ al 0.5%
- agua bidestilada c. b. p. 1000 ml.

Cuando se emplea medio sólido, se le adiciona a la solución anterior agar al 1.5%

A este medio se le designará en este trabajo como medio mínimo.

- b) La mutante de Hansenula, Cepa L₄ fue mantenida en medio mínimo sólido suplementado con 100 µg/ml de los aminoácidos L-fenilalanina y L-tirosina.
- e) La 62-1 de A. aerogenes fue mantenida en medio de gelosa nutritiva, compuesto de :

Extracto de carne al 0.3%
Peptona al 0.5%
Agar al 1.5%
agua bidestilada 100 ml.

Todas las cepas se sembraron por estrías y se incubaron a 37 ° C durante 24 h. Se almacenaron después del crecimiento en refrigeración a 4° C.

III OBTENCIÓN DEL ACIDO CORÍSMICO.

El ácido corísmico se obtuvo de la cepa 62-1 - mutante de A. aerogenes, auxótrofa para los aminoácidos L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptofano.

Como resultado de los bloqueos que se presentan en esta mutante, es capaz de acumular y excretar el ácido corísmico al medio de cultivo. (11)

Para la obtención de este ácido se hace crecer la cepa en un medio líquido (caldo nutritivo) durante 20 h, después las células son centrifugadas y resuspendidas en matraces de 2800 ml, de tipo Fernbach, que contienen un litro de medio de crecimiento(A) cada uno , con la siguiente composición:

Medio de crecimiento A.

20 ml de solución de sales minerales descrita por Vogel y Bonner.

40 ml de extracto de levadura al 5% (peso/volumen).

40 ml de casaminoácidos difco al 5% (peso/volumen).

41 mg de D, L-Triptofano.

El volumen se lleva a un litro con agua destilada y se esteriliza en autoclave a 120 °C por 15 minutos a 2.5 atm de presión .

A esta solución **estéril** se le adicionan 10 ml de una solución acuosa **estéril** de glucosa al 16% (peso/volumen).

La solución de sales descrita por Vogel y Bonner

es :

Mg SO ₄ .7H ₂ O	10 g
Acido cítrico. H ₂ O	100 g
K ₂ HPO ₄	500 g
Na NH ₄ H PO ₄ .4H ₂ O	175 g

Se disuelven los reactivos sucesivamente en 670 ml de agua bidestilada con agitación constante y a temperatura ambiente. (11)

Las células resuspendidas en el medio de crecimiento A se incuban 6 horas a 29 °C con agitación constante (225 rpm). Al final de este período se tiene una densidad óptica (D. O.) de crecimiento aproximadamente de 1.3 a 2 leída en un fotocolorímetro Bausch & Lomb modelo Spectronic 20, utilizando una longitud de onda de 620 nm.

Los cultivos son lavados con solución salina - centrifugando a 7000 rpm por 15 minutos a 4° C. Las células se resuspenden en dos matraces Fermbach con un litro de medio de acumulación cada uno, compuesto por:

Na ₂ HPO ₄	12.8 g
KH ₂ PO ₄	1.36 g
glucosa	18 g
NH ₄ Cl	2.7 g

Mg Cl₂ 0.05 M 2 ml
L- triptofano 0.01 M 1 ml
H₂O bidestilada c.b.p. 1000 ml
Este medio no se esteriliza.

El cultivo se incuba por 16 horas a 29° C con agitación (225 rpm); pasado este lapso se centrifugan los cultivos a 7000 rpm 15 minutos a 4° C y se colecta el sobrenadante. Para comprobar que se acumuló el ácido al finalizar la fermentación se toma una muestra del sobrenadante, se diluye 1:10 con NaOH.1N y se lee en el espectrofotómetro a 274 nm debiendo dar una extinción (ϵ) de 1.07 .

Por la inestabilidad del ácido corísmico a temperatura ambiente en solución acuosa, todas las operaciones para su extracción se llevan a cabo a una temperatura de 0° - 4° C .

El sobrenadante se ajusta a pH 7.5 con KOH 5N y se pasa a presión por una columna de 40 X 3 cm con 25 g de resina Dowex 1-Cl X 200, que previamente se trató con NaOH 1 N y después con agua destilada hasta tener un pH neutro . La resina para activarse se lava con HCl 1N y después con agua destilada hasta pH neutro.

El flujo de la columna se ajusta a 15 ml/minuto, e cuando se ha pasado todo el sobrenadante, se lava la columna con 100 ml de agua destilada.

El ácido corísmico se adhiere a las cargas iónicas de la resina (iones cloruro) y forma la sal de amonio al ser eluido con NH Cl 1N pH 8.5 . El flujo de la columna, para la elución, se ajusta a 1 ml/ minuto. Se colectan fracciones de 10 ml de las que se hacen diluciones 1:300 con agua , midiéndose su extinción a 274 nm contra un blanco de agua . Las fracciones con una lectura menor de 0.2

se descartan, las demás se colectan y se acidifican con HCl 1N hasta pH de 1.5, para formar el ácido. Posteriormente se extrae con éter etílico (dos o tres extracciones) hasta que la capa acuosa tenga menos de un 10% de la extinción total original.

Las extracciones etéreas se combinan y se lavan con agua. Posteriormente se secan sobre $MgSO_4$ a $4^\circ C$ durante toda la noche, después se concentran hasta aproximadamente - 30 ml en un rotavapor a $20^\circ C$. Al volumen concentrado se le adiciona éter de petróleo hasta que se forme un precipitado fino y persistente. El ácido corísmico se cristaliza sobre un baño de hielo etanol y los cristales se secan sobre pentóxido de fósforo al vacío (se almacena a $-20^\circ C$). (24)

Mediante este procedimiento se obtiene el ácido corísmico con un 93% de pureza.

La comprobación de que el producto obtenido es el ácido corísmico se realiza mediante los siguientes criterios

- a) Punto de fusión.
- b) Espectro en ultra violeta.

DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA. ✓

Para la determinación el primer paso es la obtención de la enzima que se encuentra en la levadura; para ello se hace crecer Handenula polymorpha en un matraz Erlenmeyer de 50 ml con 10 ml de medio mínimo, durante 20 horas a $37^\circ C$ y con agitación (225 rpm). El crecimiento se transfiere a un matraz Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 100 ml de medio mínimo durante 12 horas con las condiciones anteriores. El crecimiento de este matraz sirve de inóculo a un matraz -

tipo Fernbach de 2800 ml que contiene un litro de medio - mínimo, el cual se incuba por espacio de 14 horas con las - condiciones antes mencionadas. Pasada la incubación las células se lavan dos veces por centrifugación a 7000 rpm durante 25 minutos a 4° C con una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 6. las células ya lavadas se resuspenden en el menor volumen de la solución amortiguadora y se rompen por homogeneización durante una hora a 4°C.

Para separar la proteína liberada durante la homogeneización se centrifuga a 12 000 rpm durante 20 minutos a 4° C y el sobrenadante se pasa a través de una columna de sefadex G-25 para eliminar los metabolitos pequeños, eluyéndose después con la misma solución amortiguadora.

Se descarten los primeros 11 ml y se colectan fracciones de 5 ml. La proteína se eluye en las siguientes 3 ó 4 fracciones .

La proteína se cuantifica por el método de Lowry (19). Este método tiene como base la formación de un complejo colorido entre el grupo fenólico (o el grupo aromático, en el caso de Triptofano, histidina y fenilalanina) de la tirosina de las proteínas y el ácido fosfowolfamo-molibdico (color oro) que oxida al grupo hidroxilo de la tirosina en condiciones alcalinas, dando un color azul intenso que se puede medir a 625 nm.

La concentración de proteína se determina por comparación con una curva estándar de albúmina sérica bovina.

La determinación se realiza de la siguiente forma:

- a) se toma una alícuota de 0.1 ml de la solución de proteína y se afora a un ml con agua destilada.
- b) Se le adicionan 5 ml de una solución que se prepara con

El sistema de reacción para la enzima corismato mutasa básicamente consiste en:

SUSTRATO.- Acido corísmico en una concentración de 0.01M, las alícuotas que se tomaron de esta solución se variaron de acuerdo a la determinación que se pretendía realizar.

ENZIMA.- Se encuentra en la proteína obtenida.

SOLUCION AMORTIGUADORA.- De fosfatos 0.1 M. El pH de la solución se varió hasta encontrar el adecuado para la reacción.

Para algunas determinaciones se emplearon los aminoácidos aromáticos.

La cantidad de los reactivos añadidos varió de acuerdo al experimento , pero siempre en un volumen final de un mililitro.

El orden en el que se añadieron los reactivos es :

- 1.- Solución amortiguadora.
- 2.- Solución de proteína.
- 3.- Se preincuba durante 5 minutos a 37 °C.
- 4.- Se inicia la reacción por la adición del ácido corísmico. Se agita y se incuba por 20 minutos a 37 °C
- 5.- La reacción se detiene colocandola en hielo.

En la reacción se forma el ácido prefénico que es un compuesto con una vida media muy corta, por lo que se le transforma en ácido fenil pirúvico que es más estable y se puede identificar en el espectrofotómetro utilizando una longitud de onda de 320 nm.

Para la transformación del ácido prefénico en ácido fenil pirúvico se realizó lo siguiente:

- a) Se toma una alícuota de 0.4 ml del sistema de reacción y se le adicionan 0.4 ml de HCl 1N, ya que se requieren condiciones ácidas para la transformación en ácido fenil pirúvico.
- b) Se deja incubar durante 10 minutos a 37° C y se detiene la reacción con 3.2 ml de NaOH 1 N.

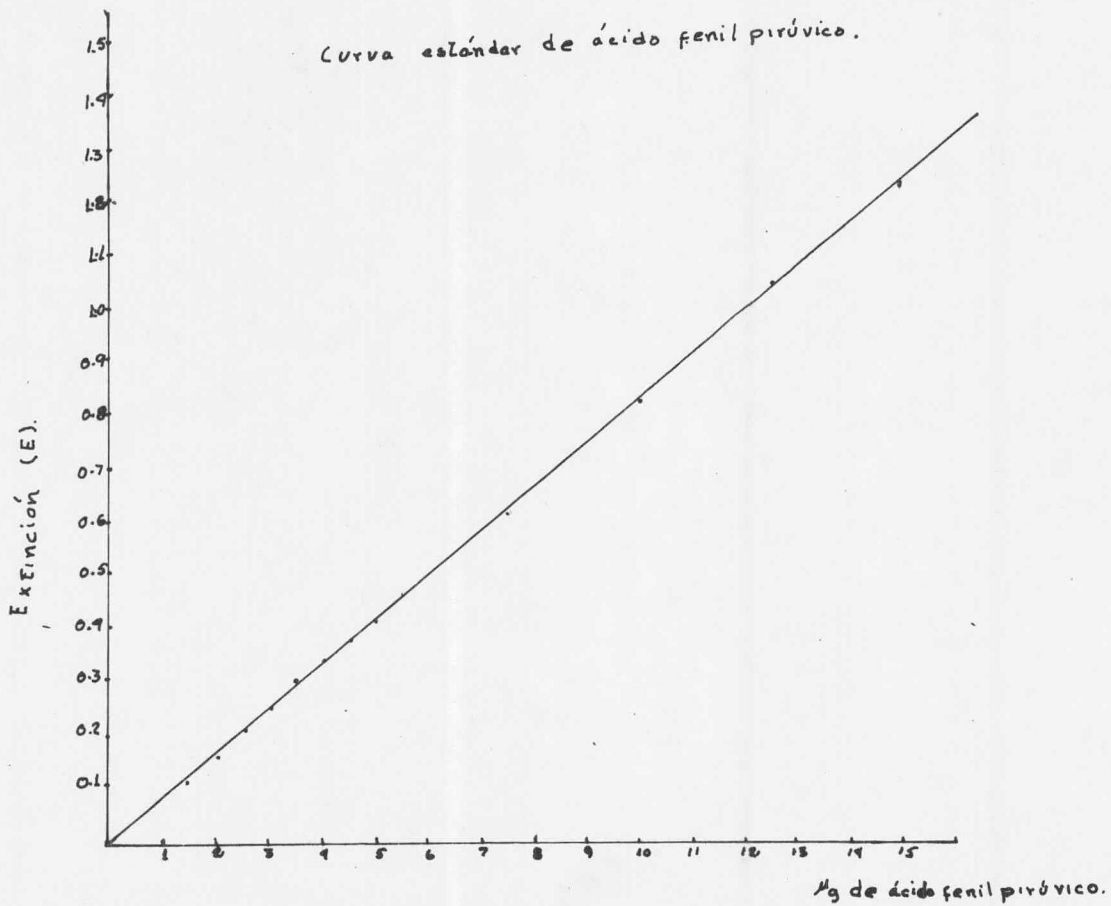
El ácido fenil pirúvico se lee en el espectrofotómetro Carl Zeiss a 320 nm utilizando celdas de cuarzo de 1 ml y luz ultra violeta.

Se corre una curva estándar de ácido fenil pirúvico en NaOH 1N y la actividad se expresa como μ g de ácido fenil pirúvico formado por miligramo de proteína por minuto.

REACTIVOS.

Todos los reactivos empleados se obtuvieron de casas comerciales como: Difco, Merck, J. T. Baker y no se hicieron purificaciones posteriores.

Curva estándar de ácido fenil pirúvico.



CAPITULO IV

R E S U L T A D O S .

Las determinaciones realizadas sobre la enzima corismato mutasa, se efectuaron en tres etapas:

I.- Optimización de las condiciones de reacción.

II.- Investigación de los mecanismos regulatorios.

1.- A nivel de la actividad enzimática

a) Activación.

b) Inhibición.

2.- A nivel de la síntesis de la enzima.

a) Inducción.

b) Represión.

III.- Caracterización enzimática de la cepa L₆, doble auxótrofo parcial de H. polymorpha, que requiere los aminoácidos L-tirosina y L-fenilalanina para crecer bien.

I.- Las condiciones que se emplearon para la primera etapa fueron elegidas de la literatura para otros microorganismos (3, 13, 18). Dichas condiciones se variaron - hasta encontrar las que se consideraron adecuadas.

El objetivo del primer ensayo fue determinar la actividad enzimática en H. polymorpha. Para lo que se realizó una prueba de actividad contra concentración - de proteína en un extracto exento de células. Los resultados (gráfica I) indican linealidad con respecto a ella hasta un máximo de 0.3 mg de proteína en el sistema de reacción.

Dentro de los parámetros estudiados, se probaron diferentes valores de pH, obtenidos utilizando una solución amortiguadora de fosfato de potasio con diferentes valores de pH. Como se puede notar en la gráfica II se obtiene mayor actividad a pH 6, decreciendo gradualmente al ser más alcalino el medio de ensayo.

Otro parámetro estudiado fue la temperatura, factor que se consideró importante en base a los reportes existentes en la literatura, de conversión no enzimática del ácido corísmico en ácido prefénico, cuando se encuentra a temperaturas superiores a los 37° C. Como puede observarse en la gráfica III -a, la actividad obtenida fue máxima en un rango de 35° a 45° C, sin embargo la conversión del ácido corísmico, no enzimática, es significativa (gráfica III -b) por lo que se decidió seguir utilizando 37° C en las determinaciones posteriores.

El efecto del tiempo de incubación puede verse en las gráficas IV-a y IV-b. La actividad enzimática es prácticamente lineal hasta los 30 minutos de incubación a 37° C y pH 6, por lo que se eligió para estandarizar las condiciones de ensayo el intervalo de 20 minutos.

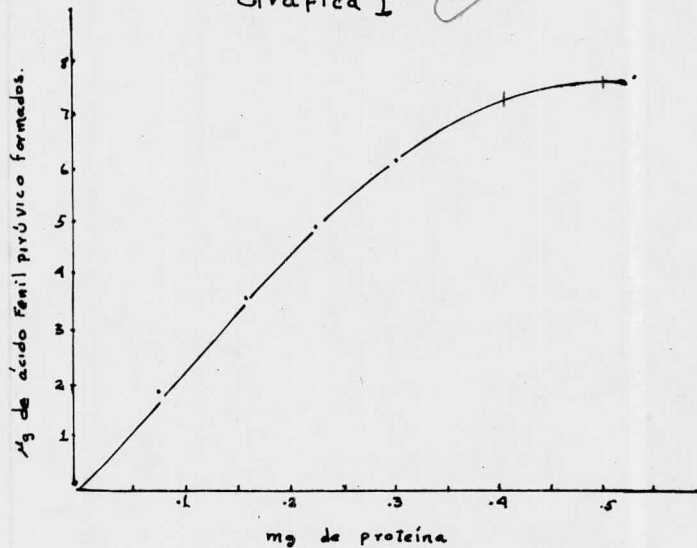
Con las condiciones obtenidas se procedió a medir la afinidad de la enzima por su sustrato (gráfica V). Determinado el efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática y graficando los resultados de acuerdo a Hanes- Woolf, (25) es decir S/V contra concentración de sustrato. En base a los resultados los valores para las constantes K_m y $V_{máx}$ fueron de $7.5 \times 10^{-4} M$ y 1.07×10^{-4} moles/minuto/mg de proteína, respectivamente.

II.- Mecanismos regulatorios.

1.- A nivel de la actividad enzimática:

μg de ácido fólico producido formados.

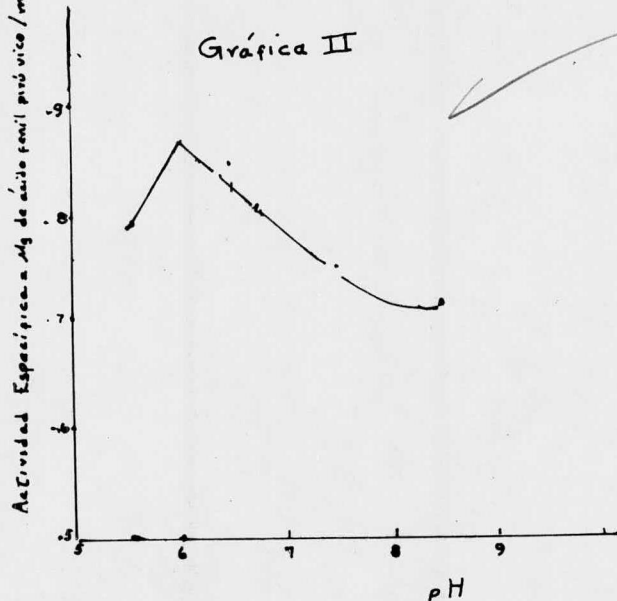
Gráfica I



Actividad enzimática de la coxismato mutasa.
de la cepa silvestre de *H. polymorpha*

Actividad Especifica μg de ácido fólico / mg de proteína / minuto.

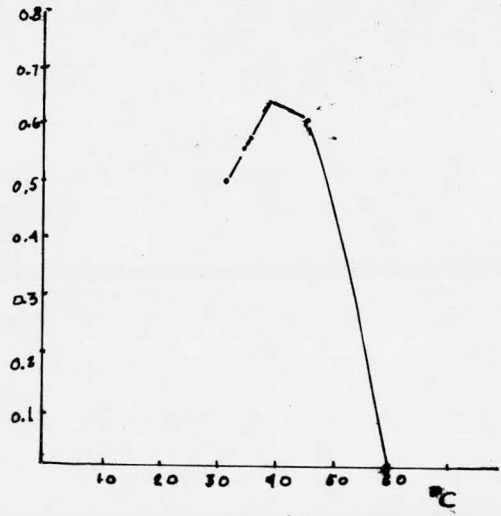
Gráfica II



Influencia del pH sobre la
actividad de la enzima coxismato
mutasa.

Gráfica III.

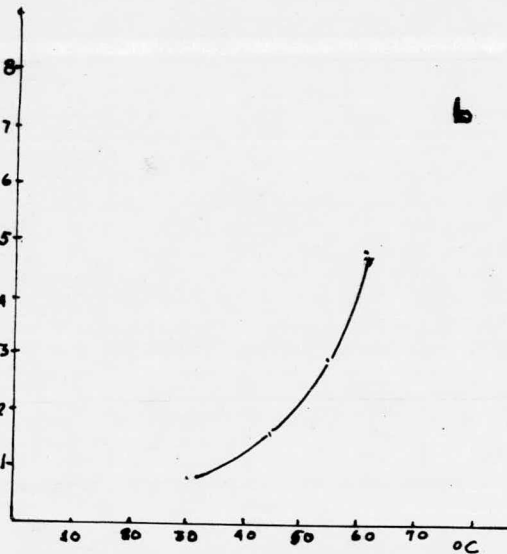
Actividad específica =
Mg de ácido fenil pirúvico/mg de proteína/min.



Temperatura en grados centígrados

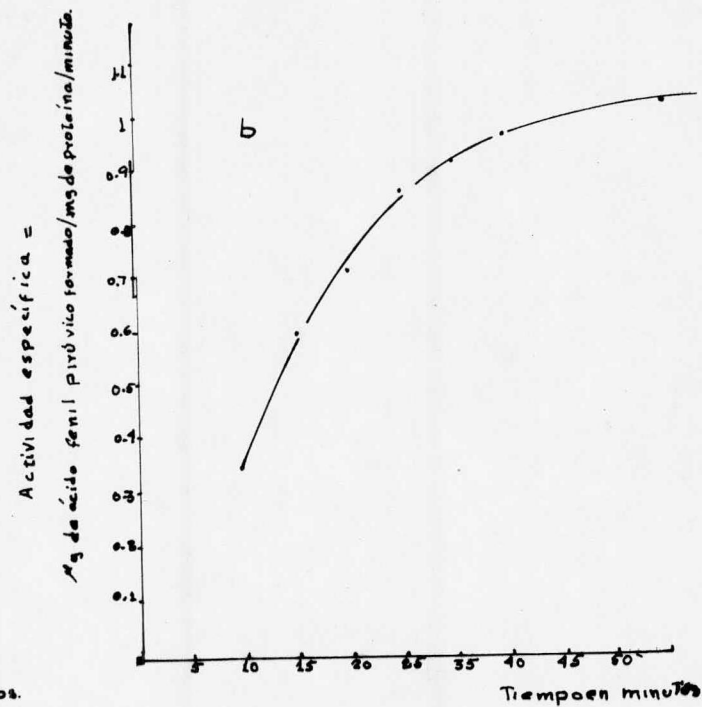
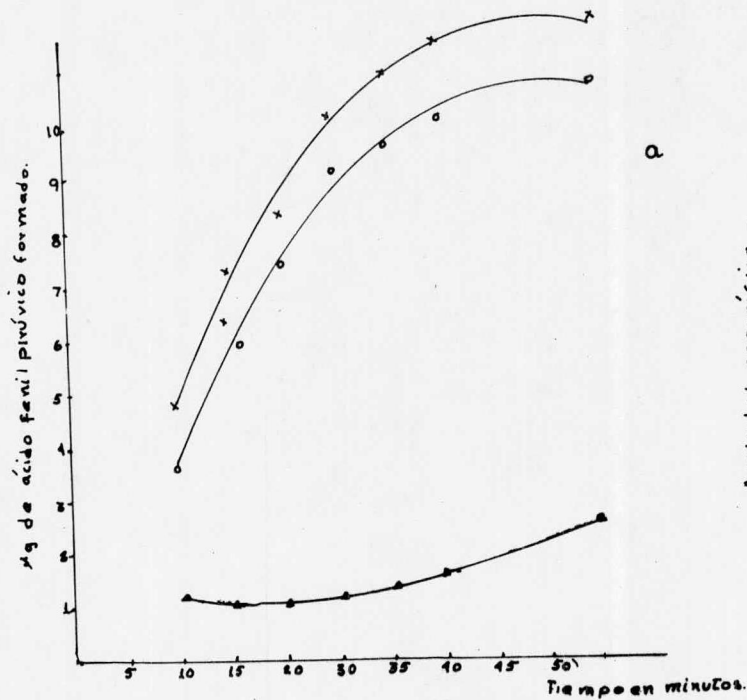
Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de la aspartato aminasa.

Mg de ácido fenil pirúvico formado.



Temperatura (grados centígrados)

Transformación no enzimática del ácido aspartámico por efecto de la temperatura.

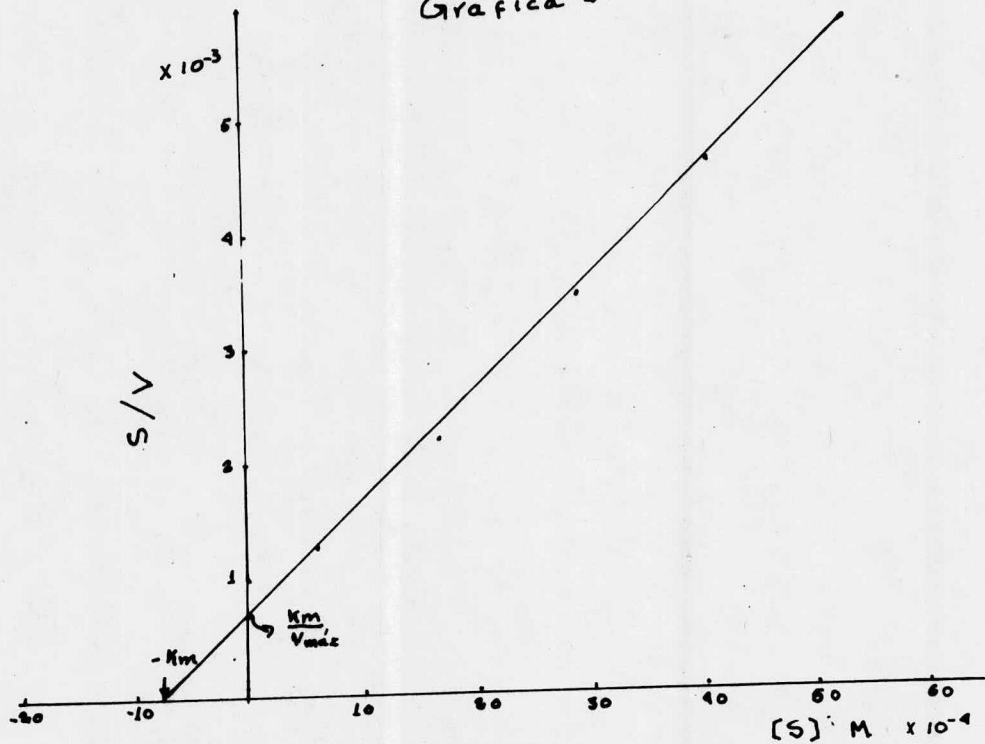


Gráfica IV Variación del tiempo de incubación

- a
- x = Transformación espontánea de ácido corísmico en ácido pirúvico.
 - o = Mg totales de ácido fenil pirúvico formados durante la reacción menos los Mg formados no enzimáticamente.
 - = Mg totales de ácido fenil pirúvico formados

b Actividad específica de la corimato mutasa en diferentes intervalos de incubación

Gráfica V



Afinidad de la enzima por su sustrato

$$-K_m = -7.5 ; K_m = 7.5 \times 10^{-4} \text{ M.}$$

$$V_{\max} = 1.07 \times 10^{-4} \text{ Mmoles de pentil pirúvico / mg de proteína / minuto.}$$

Para demostrar la existencia de fenómenos de retro-regulación sobre la enzima, se estudió el efecto de los aminoácidos aromáticos L-fenilalanina, L-tirosina y L-triptofano, sobre la actividad enzimática in vitro. Como puede observarse en la gráfica VI, la enzima corismato mutasa es inhibida significativamente por el aminoácido L-tirosina, en comparación a los aminoácidos L-triptofano y L-fenilalanina. Experimentos adicionales mostraron que la enzima es inhibida incompetivamente por L-tirosina con un valor de $K_i = 0.25 \times 10^{-6} M$ (gráfica VII).

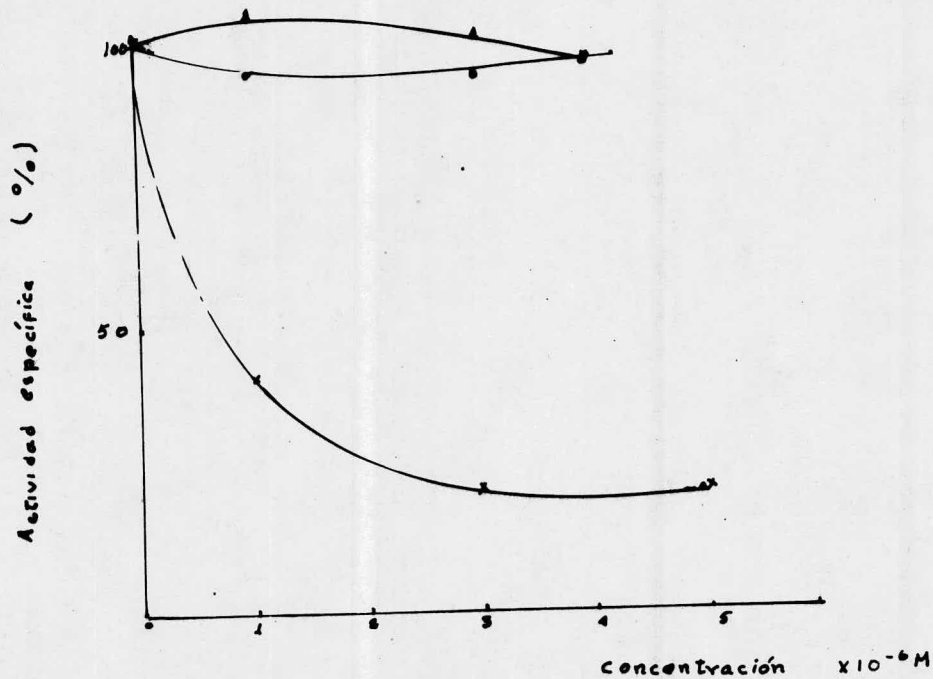
2.- A nivel de la síntesis de la enzima:

En esta fase se estudió el efecto de los aminoácidos en la formación de la enzima. Para ello se adicionaron al medio de cultivo, desde que se inicia el crecimiento, los aminoácidos aromáticos en concentraciones de $100 \mu g/ml$ de medio. Como puede observarse en la gráfica VIII, la concentración de la enzima corismato mutasa se ve disminuida cuando las células se hacen crecer en presencia de L-tirosina. Bajo las condiciones experimentales aquí empleadas no se observó ningún efecto importante producido por los otros dos aminoácidos, sin embargo cuando se utilizaron combinaciones de ellos, L-fenilalanina parece revertir el efecto de L-tirosina.

III.- Caracterización de un doble auxótrofo de *S.H. polymorpha* (cepa L_6)

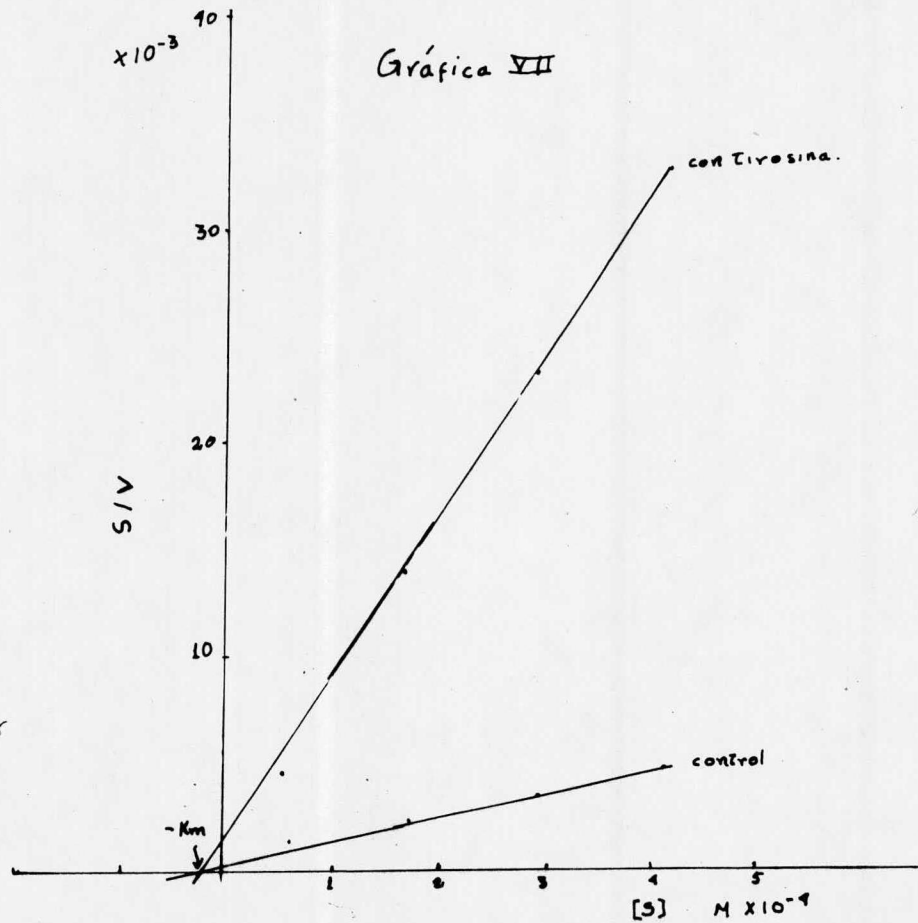
Una vez establecidas las condiciones para medir la actividad de la enzima y conociendo algunos de los mecanismos regulatorios, se caracterizó enzimáticamente la cepa L_6 , capaz de producir y excretar al medio de cultivo

Gráfica VI



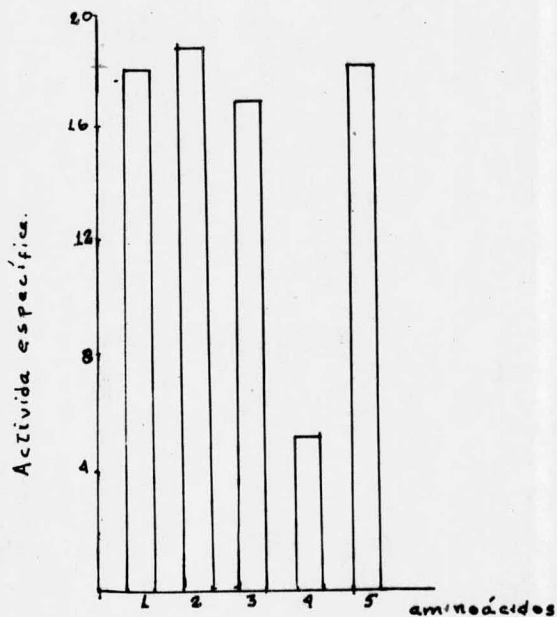
Efecto de los aminoácidos cuando están presentes
en el medio de reacción
 Δ = Tryptopano ; o = fenilalanina ; x = Tirosina.

1
 Δ
 Δ
1



Efecto de la tirosina en la enzima *tyrosina mutasa* sobre su afinidad por el sustrato.

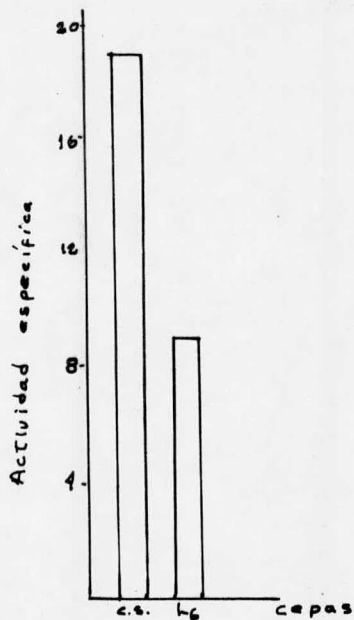
Gráfica VIII



Cepa silvestre de *H. polymorpha*
 crecida en presencia de los aminoácidos.
 (100 Mg/ml de medio)

1 = control; 2 = triptofano; 3 = fenilalanina.
 4 = tirosina; 5 = fenilalanina + tirosina.

Gráfica IX



Comparación de la actividad
 específica de la Cepa L₆ con
 la cepa silvestre (C.S.) cre-
 cidas en L-fenilalanina + L-tirosina
 (100 Mg/ml de medio)

más del doble de L-triptofano que la cepa original. Cuando se hacen crecer las cepas antes mencionadas en presencia de los aminoácidos fenilalanina y tirosina, la concentración de la enzima en la mutante fue aproximadamente un 50% menor que en la cepa silvestre (gráfica IX) .

CAPITULO V.

CONCLUSIONES.

De los experimentos realizados para este trabajo se puede concluir que :

- a) Las condiciones óptimas de funcionamiento de la enzima corismato mutasa en la levadura H. polymorpha en un extracto exento de células son : pH 6, Temperatura = 37° C, Tiempo de incubación = 20 minutos y no necesita cofactores.
- b) Los valores obtenidos para K_m y $V_{máx}$ son : 7.5×10^{-4} M. y 1.07×10^{-4} μ moles/minuto/mg de proteína. respectivamente. Este valor de K_m es intermedio en relación a los reportados para esta constante en otros microorganismos, lo que indica que su afinidad por el sustrato es grande (2, 3, 15, 18, 22, 23,).
- c) Los estudios regulatorios mostraron que a nivel de la actividad enzimática hay inhibición producida por el aminoácido L-tirosina lo que está de acuerdo con lo reportado para C. glutamicum (13) S. cerevisiae (17) E. coli (22) y N. crassa (3).

A nivel de la síntesis de la enzima también la tirosina tiene efectos de represión, en cambio los otros dos aminoácidos probados no mostraron ningún efecto importante. La fenilalanina parece revertir la represión ejercida por la tirosina cuando se hace crecer esta levadura en presencia de ambos aminoácidos.

El tipo de inhibición ejercida por la tirosina de acuerdo a las gráficas de Hanes - Woolf, es incompetitiva por que su K_m no cambia, pero sí su $V_{máx}$ -

gráfica VII.

d) La cepa L₆ posee sólo un 50% de la concentración de la enzima corismato mutasa que la de la cepa silvestre, - esto podría explicar en cierta forma el hecho de que - produzca mayor concentración de L-triptofano; puesto - que la enzima no utilizará todo el sustrato que le corresponde y el ácido corísmico excedente será transfor mado por la enzima antranilato sintetasa en ácido antrá nílico, metabolito de la síntesis de triptofano.

BIBLOGRAFIA.

- 1.-Alexopoulos C. J.
Introductory Mycology.
2nd Edition, John Wiley and Sons Inc.
- 2.- Barker T. I.
Tryptophan: a feedback activator for chorismate mutase from Neurospora.
Biochem. 5, 2654 (1966).
- 3.- Calhoun D. H., Pierson D. L. and Jensen R. A.
Channel - Shuttle: Mechanism for the regulation of phenylalanine and tyrosine synthesis at a metabolic branch point in Pseudomonas aeruginosa.
J. Bact. 113, 1, 241-251 (1973)
- 4.- Cook A. H.
The chemistry and biology of yeast.
Edited by A. H. Cook.
Academic Press Inc. 37-38 (1958).
- 5.- Cotton G. H. R. and Gibson F.
The biosynthesis of phenylalanine and tyrosine; enzymes converting chorismic acid into prephenic acid and their relationships to prephenate dehydrogenase.
Biochem. Biophys Acta 100, 76-88 (1956)
- 6.- Cotton G. H. R. and Gibson F.
The biosynthesis of phenylalanine and tyrosine in the pea (Pisum sativum) chorismate mutase.
Biochem. Biophys Acta 156, 187-189 (1968)
- 7.- Changeux Jean Pierre.
The control of biochemical reactions.
Scientific American 212, 4, 36-45 (1965)
- 8.- Cronquis Arthur.
Introducción a la botánica . 1 Edición en español.

kd. Continental México 1969 237 - 238.

9.- Edwards J. M. and Jackman L. M.

Chorismic acid; a branch point intermediate in aromatic biosynthesis.

Aust. J. Chem. 18, 1227 -1239 (1965).

10.- Fink G. R.

The biochemical genetics of yeasts.

Methods in Enzymol. XVII, 4 59 - 78 (1970)

11.- Gibson F.

Chorismic acid: Purification and some chemical and physical studies.

Biochem. J. 90, 256 (1964)

12.- Gibson M. and Gibson F.

Preliminary studies on the isolation and metabolism of an intermediate in aromatic biosynthesis, chorismic acid.

Biochem. J. 90, 248 (1964)

13.- Hagino H., and Nakayama K.

Regulatory properties of chorismate mutase from Corynebacterium glutamicum.

Agr. Biol Chem. 39, 2, 331-342 (1975)

14.- Hagino H.

Control mechanisms in aromatic aminoacid biosynthesis and aminoacid production.

Agr. Biol Chem. 50, 1, 79-87 (1976)

15.- Levine D. W. and C. L. Cooney.

Isolation and characterization of a thermotolerant methanol utilizing yeast.

Appl. Microbiol 26, 982 - 990 (1973).

16.- Lehninger Albert.

Biochemistry. Worth publishers Inc. (1975).

- 17.- Lingens F. , W goebel and H. Uessler.
Regulation der Biosynthese der Aromatischen Amino-
säuren in S. cerevisiae
Eur. J. Biochem. 1, 363 (1967)
- 18.- Lorence. J. H. and Nester E. W.
Multiple molecular forms of chorismate mutase in
Bacillus subtilis.
Biochem. 6, 1941 (1967).
- 19.- Lowry O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J.
Randall.
Protein measure with Folin phenolreagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)
- 20.- Nester E. W. , Lorence J. H/ Nasser.
An enzyme aggregate involved in the biosynthesis
of aromatic aminoacid in Bacillus subtilis, its
possible funtion in feedback regulation.
Biochem. 6, 1553 (1967).
- 21.- Salcedo O. N.
Apuntes de microbiología Facultad de Química
UNAM (1971).
- 22.- Sanwal B. D. Kapoor, H. W. Duokworth.
The regulation of branched and converging pathways
Current Topics in cell. Regul. 3, 1 -113
Academic press Inc. New York (1971).
- 23.- Schmitt J. C. and Zalkin
Chorismate mutase- prephenate dehydratase. Partial
purification an properties of the enzyme from -
Salmonella typhimurium.
Biochem, 8,1, 174-181 (1969).

- 24.- Sidney P. Colowick and Nathan O. Kaptan.
Methods in Enzymol XVII, A, Academic Press. 362- 364
New York and London (1970).
- 25.- Segel I. H.
Biochemical calculations 2° edition.
John Wiley and Sons Inc. New York London (1976)
- 26.- Tietz N. W.
Química clínica moderna.
Nueva editorial Interamericana. 1 edición.
(1972) 193-194.
- 27.- Wickerham L. J.
Hansenula polymorpha de Morais et Maia.
The yeast. A taxonomic study 296 -299.
- 28.- Yamada K. , S. Kinoshita et al.
The microbial production of aminoacids.
Kodansha Ltd. Tokyo (1972).



Impresiones Lupita

MEDICINA No. 25
FRACC. COPILCO UNIVERSIDAD
CIUDAD UNIVERSITARIA, D. F.
TEL. 548-49-79